

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21419

研究課題名（和文）植物ホルモンによる植物の形態形成と生体防御の統御機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of the regulation mechanism of plant defense and morphogenesis by phytohormones

研究代表者

笠原 博幸（Kasahara, Hiroyuki）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：00342767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：オーキシンは植物の様々な形態形成や環境応答を制御する植物ホルモンである。オーキシンの中で、インドール-3-酢酸（IAA）の機能解明が進んでいるのに対し、フェニル酢酸（PAA）の役割がまだ不明である。本研究では、PAAが内皮細胞の細胞壁を構成するスベリン層やカスパリー線の形成を調節することにより生体防御に関与している可能性を調べた。RNA-seq解析の結果、PAAはスベリン層形成に関わる多くの遺伝子の発現を誘導することが示唆された。また実際にPAAはスベリン層の形成を促進することが顕微鏡解析により示された。一方、PAAとIAAの両方がカスパリー線形成に関わる遺伝子の発現を抑制することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の形態形成や生体防御の仕組みを解明することは、植物科学の基礎においても、また農作物の増産などにも繋がる重要課題である。本研究では、内皮細胞の細胞壁であり物質輸送の障壁として重要なスベリン層とカスパリー線の形成に関わる遺伝子が、植物ホルモンのオーキシンによる発現調節を受けることを明らかにした。これまで生理的役割が不明であるオーキシンのフェニル酢酸(PAA)をシロイヌナズナに処理すると、スベリン合成遺伝子の発現を誘導し、また根でスベリン層の形成を促進することが観察された。以上の結果などから、PAAが植物の生体防御において重要な役割をもつ可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Auxin is a plant hormone that regulates morphogenesis and response to environment in plants. Among natural auxins, the physiological function of indole-3-acetic acid (IAA) has been elucidated, while the role of phenylacetic acid (PAA) is still unknown. In this study, we investigated the possibility that PAA is involved in plant defense through the regulation of suberin lamellae and Casparian strip formations. RNA-seq analysis suggests that PAA induces the expression of various genes involved in the formation of suberin lamellae. In addition, the results of microscopic analysis showed that PAA treatment promotes the formation of suberin lamellae in Arabidopsis. On the other hand, both PAA and IAA were found to suppress the expression of various genes involved in Casparian strip formation.

研究分野：植物生化学

キーワード：オーキシン スベリン カスパリー線 フェニル酢酸 生体防御

1. 研究開始当初の背景

オーキシンは植物の様々な形態形成を制御する植物ホルモンである。これまでインドール-3-酢酸 (IAA) の生理活性や極性移動する特徴をもとに、オーキシンを介した植物の成長や分化、環境応答の調節原理が説明されてきた。私たちはフェニル酢酸 (PAA) がオーキシン受容体に結合するが、重力方向に極性移動しないユニークな特徴を持つオーキシンであることを発見した。これにより植物は2種類のオーキシンを使って植物の様々な生理現象を制御している可能性が示唆された。最近、私たちはシロイヌナズナを使ったオーキシン応答遺伝子の解析から、PAA 処理により多数の生体防御関連遺伝子の発現が誘導されることを見出した。これにより、PAA が植物の生体防御に重要な役割を持つオーキシンである可能性が示唆された。

2. 研究の目的

これまで RNAseq を用いたシロイヌナズナのオーキシン応答遺伝子解析により、IAA 特異的、PAA 特異的、そして IAA と PAA に共通して発現量が変動する遺伝子をそれぞれ同定してきた。そして、PAA 特異的に発現量が変動する遺伝子の中には細胞壁関連、植物免疫関連、根発生関連のものが多く含まれていることが明らかになった。本研究では、PAA が植物の生体防御に重要な役割を持つオーキシンである可能性を検証する。特に、細胞壁関連のスベリン層およびカスパリー線の形成に関連する遺伝子に着目し、IAA と PAA の役割の相違点を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナで IAA と PAA に応答する遺伝子の網羅的解析から、スベリン層とカスパリー線の形成にオーキシンが関係している可能性が強く示唆されたことから、これらの形成に関与する遺伝子群の変動をさらに詳細に調べた。また、PAA と IAA をそれぞれ処理したシロイヌナズナの根のスベリン層の顕微鏡解析や、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を使ったスベリンの定量分析を行った。また、液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を使ってシロイヌナズナのスベリン関連遺伝子欠損変異体のオーキシン代謝物分析なども行った。これらの研究手法を組み合わせ、スベリン層やカスパリー線の形成におけるオーキシンの役割について検証を進めた。

4. 研究成果

シロイヌナズナにおいて IAA と PAA に応答する遺伝子の発現パターンを RNAseq により網羅的に解析した結果、IAA 特異的に応答する遺伝子の多くは処理後1時間から3時間で発現量が変化するのに対し、PAA 特異的に応答する遺伝子は6時間から12時間後に発現量が変化するものが多いという差が見られた。また、IAA と PAA に共通して応答した遺伝子は、6時間後に発現量が変動するものが多いことも示された。PAA 特異的に応答したものは264遺伝子あり (図1)、

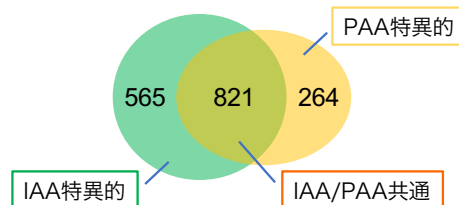


図1. シロイヌナズナのPAAおよびIAA応答遺伝子数

その中で細胞壁関連、植物免疫関連、根発生関連の遺伝子が特に発現量の変動が顕著であった。PAA は他の植物ホルモンの調節にも関与しており、エチレンとブラシノステロイドの生合成遺伝子の発現を促進し、サイトカイニン代謝遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

PAA 処理により発現量が変動した遺伝子は、根毛細胞や維管束組織で発現するものが多かった。特に、細胞壁関連ではスベリン層の形成に関連する遺伝子の発現が顕著に誘導されることが明らかになった。スベリンは内皮細胞の周囲に形成される蠟状物質で、細胞外から内皮細胞内への物質の流入を物理的に防ぐと考えられている。また、内皮細胞間を塞ぐように形成されるカスパリー線とスベリン層を組み合わせた構造が、アポプラストを通る物質輸送の障壁として働くことが知られている。そこで、スベリン層形成に関連する遺伝子の発現を詳しく調べたところ、IAA と PAA の両方が、これらの遺伝子の発現を誘導するが、その作用は PAA の方が強い傾向が見られた。具体的には、スベリン層の形成に重要なシトクロム P450 モノオキシゲナーゼをコードする *HORST* (*CYP86A1*) 及び *RALPH* (*CYP86B1*)、そして ABC トランスポーターをコードする *ABCG2* と *ABCG20* などの遺伝子が PAA により強く発現誘導された (図2)。また、スベリン層形成に関連する転写因子の *MYB39* (*SUBERMAN*) などの遺伝子は IAA と PAA の両方で発現が誘導された。

さらに、PAA を処理したシロイヌナズナの根を詳細に調べると、通常はスベリンが蓄積しない根端の内鞘細胞や側根原基でスベリンが顕著に蓄積することが顕微鏡による観察から明らかになった。一方、IAA を処理したシロイヌナズナでは、このような異所的なスベリンの蓄積は見られず、内皮におけるスベリンの蓄積パターンが変化した。これらの結果から、PAA と IAA はスベリンの蓄積において異なる作用を及ぼすことが示唆された。興味深いことに、PAA と IAA はいずれもカスパリー線形成に関わる遺伝子の発現を負に制御していることが示された。具体的には、

ESB (ENHANCED SUBERIN 1) および CASP (CASPARIAN STRIP MEMBRANE DOMAIN PROTEIN) ファミリーをコードする遺伝子の発現量が、PAA と IAA のどちらの処理でも低下した。以上のように、オーキシシン処理したシロイヌナズナの RNAseq 解析とスベリン層の顕微鏡観察の結果から、オーキシシンがスベリン層とカスパリー線の形成に関与しており、前者を促進、後者を抑制する方向に関連遺伝子の発現を制御していることが示唆された (図 3)。

スベリン層およびカスパリー線の形成とオーキシシンとの関係をさらに調べるため、それらの合成に関連する遺伝子の欠損変異体における PAA と IAA の内生量を液体クロマトグラフィー・質量分析計 (LC-MS/MS) を使って分析した。その結果、スベリン合成遺伝子を欠損したシロイヌナズナの変異体では PAA が顕著に減少していた。一方、IAA の量は変化が見られなかった。これに対して、カスパリー線の合成遺伝子を欠損した変異体では、PAA と IAA の両方が減少していた。当初、スベリンを合成できない変異体では、スベリンを蓄積させようとして PAA や IAA の量が増加するのではないかと考えていたが、予想とは異なる調節機構の存在が示唆された。

さらに、PAA や IAA の処理によってシロイヌナズナの根でスベリン層の形成が増加するか調べるため、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) を用いてスベリンを構成するモノマーの定量分析を行った。しかし、現時点ではこれらのオーキシシンを処理した根でスベリンの構成成分の有意な増加を確認することはできていない。

以上の結果は、植物のスベリン層とカスパリー線の形成制御に植物ホルモンのオーキシシンがどのように関与しているかを遺伝子や代謝物レベルで初めて明らかにしたものであり、bioRxiv にて公開した (doi: <https://doi.org/10.1101/2021.06.02.446769>)。また、論文発表に向けて追加実験を進めている。

なお、本研究の LC-MS/MS によるオーキシシン分析法を使って、フェニル酪酸 (PBA) がシロイヌナズナにおいてインドール酪酸 (IBA) とは異なる経路で β 酸化を受けて PAA へ変換されることの解明にも貢献した。

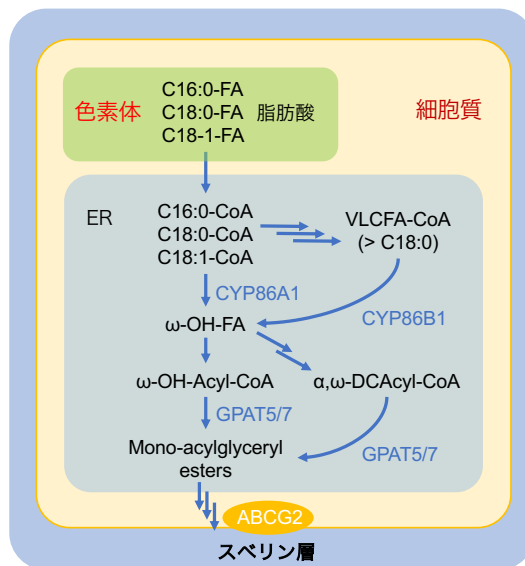


図 2. スベリン合成経路の概略図
PAAにより発現誘導された遺伝子がコードする
主な酵素 (青色) と輸送体 (黄色)



図 3. スベリン層とカスパリー線形成に関連する遺伝子の
オーキシシン応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Iwase Akira, Takebayashi Arika, Aoi Yuki, Favero David S, Watanabe Shunsuke, Seo Mitsunori, Kasahara Hiroyuki, Sugimoto Keiko | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 4-Phenylbutyric acid promotes plant regeneration as an auxin by being converted to phenylacetic acid via an IBR3-independent pathway | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Plant Biotechnology | 6. 最初と最後の頁 51 ~ 58 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.1224b | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| bioRxiv にて本研究内容を公開した（doi: https://doi.org/10.1101/2021.06.02.446769 ） |
|---|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|----------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | クック サム (Cook Sam) | | |
| 研究協力者 | 神谷 岳洋 (Kamiya Takehiro) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 | | | |
|---------|--------------------|--|--|--|
| ドイツ | University of Bonn | | | |
| スウェーデン | Umea University | | | |